

図2 *Orientia tsutsugamushi* 56kDa蛋白遺伝子  
 プライマー(10/11領域;481-507bp)  
 の塩基配列による系統樹 (NJ法により作成)

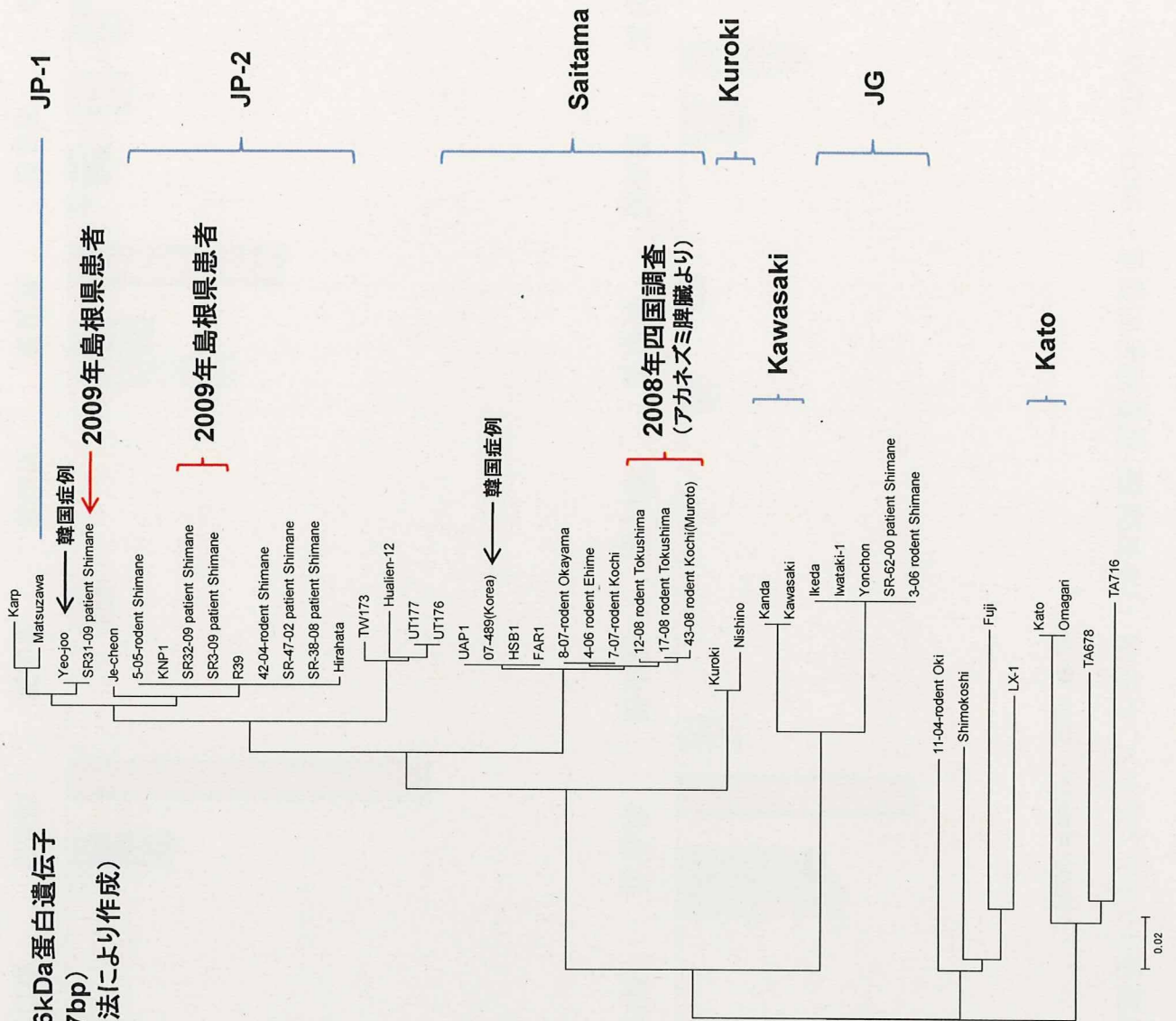


図3 *Rickettsia* 属 17kDa蛋白遺伝子および *Glt-A* 遺伝子の塩基配列による系統 (NJ法により作成)

**17kDa**  
Rr17.61p/492n  
(434bp)

**Glt-A**  
RpCS.877p/1258n  
(382bp)

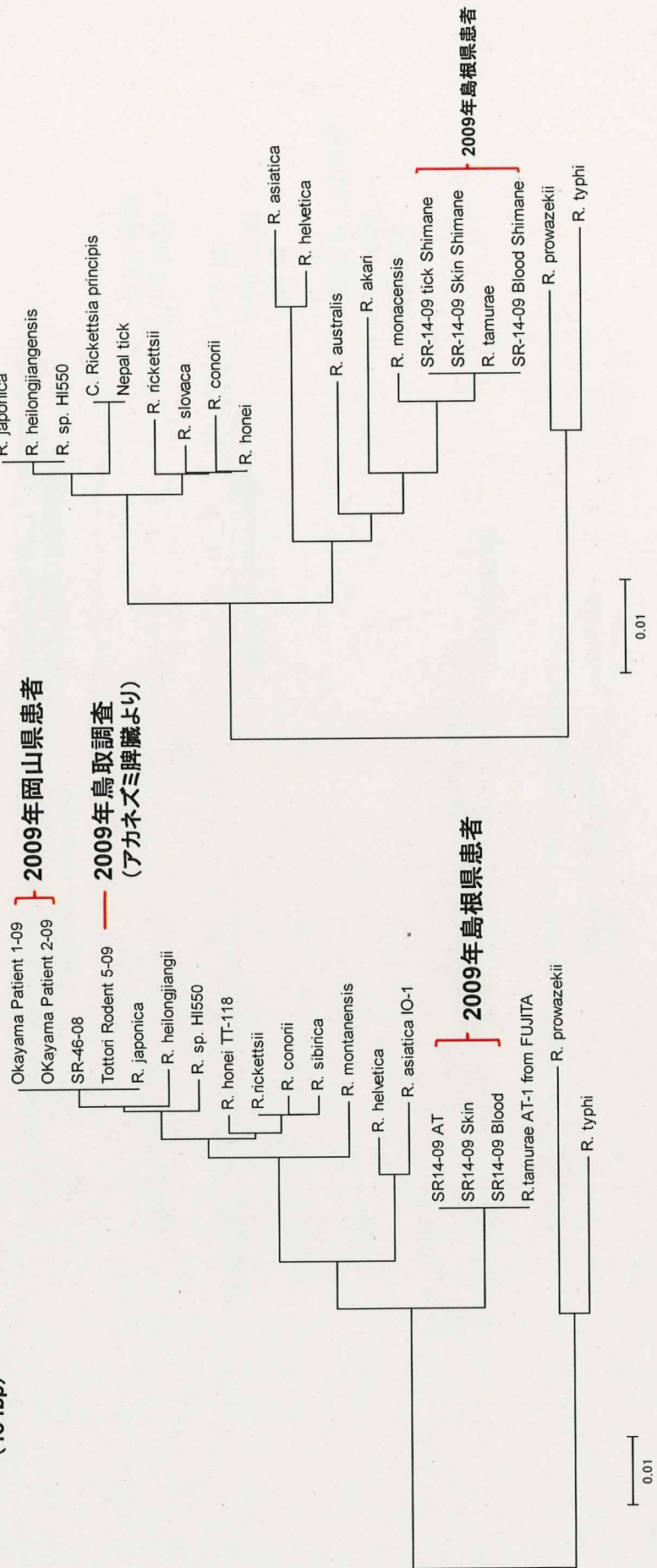


図4 Taq-Man MGB probe real-time PCR —Diagnostic assay for *Rickettsia japonica*—  
Amplification Plot

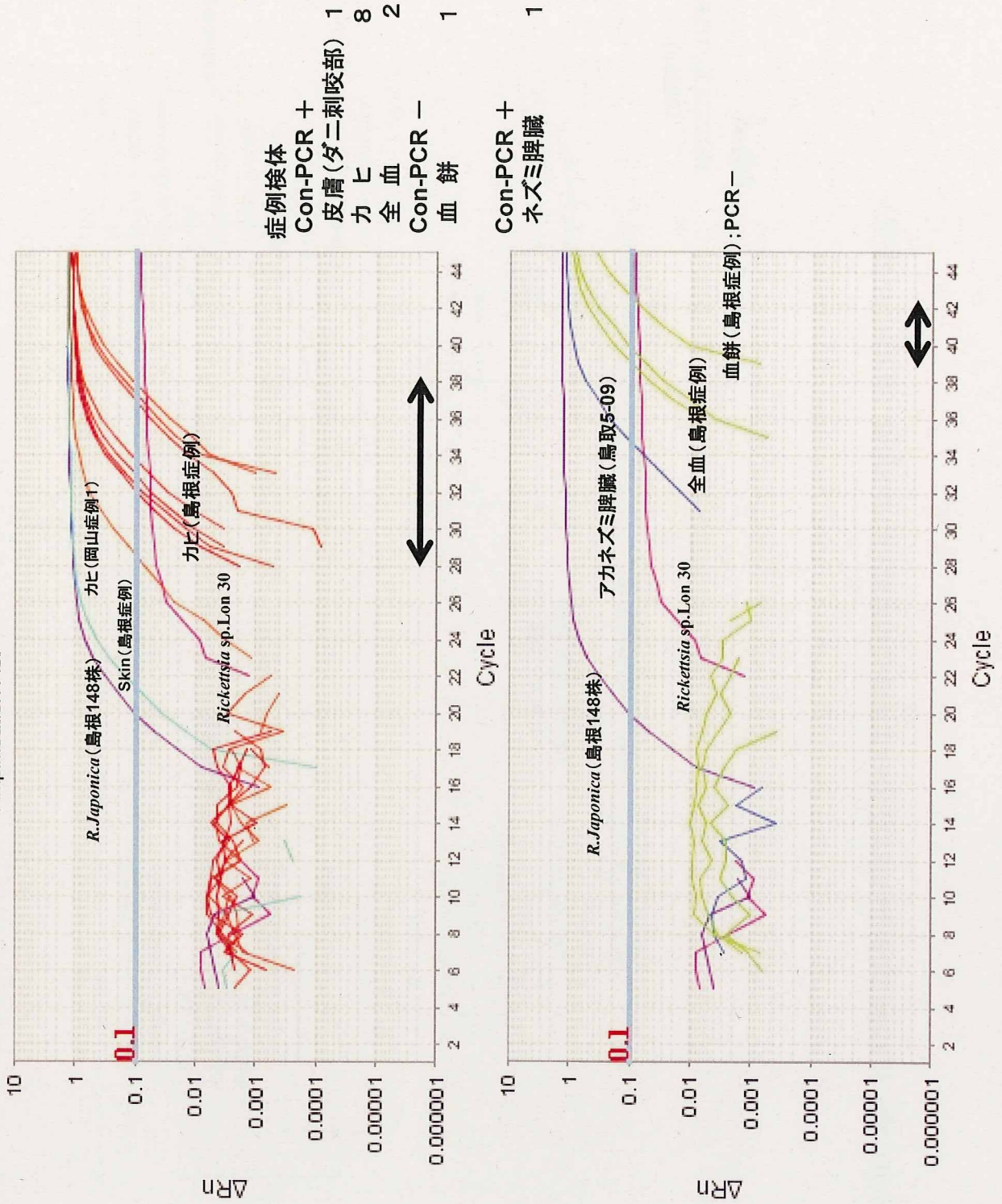


表2 島根県および岡山県における日本紅斑熱患者臨床検体からの遺伝子検査法による比較(2006年~2009年)

| No    | 病日 | 全血(9検体)  |         | 血餅(11検体) |       | カヒ(10検体) |       | 皮膚(2検体) |       |
|-------|----|----------|---------|----------|-------|----------|-------|---------|-------|
|       |    | Con-PCR* | R-PCR** | Con-PCR  | R-PCR | Con-PCR  | R-PCR | Con-PCR | R-PCR |
| 1     | 2  | -        | -       | -        | -     | -        | -     | -       | -     |
| 2     | 2  | -        | -       | -        | -     | -        | -     | -       | -     |
| 3     | 3  | -        | -       | -        | -     | +        | +     | +       | +     |
| 4     | 3  | -        | -       | -        | -     | +        | +     | +       | +     |
| 5     | 3  | -        | -       | -        | -     | -        | -     | -       | -     |
| 6     | 3  | -        | -       | -        | -     | +        | +     | +       | +     |
| 7     | 4  | -        | -       | -        | -     | +        | +     | +       | +     |
| 8     | 4  | +        | +       | +        | +     | +        | +     | +       | +     |
| 9     | 4  | -        | -       | -        | -     | -        | -     | -       | -     |
| 10    | 4  | -        | -       | -        | -     | -        | -     | -       | -     |
| 11    | 5  | +        | +       | +        | +     | +        | +     | +       | +     |
| 12    | 5  | +        | +       | -        | -     | -        | -     | -       | -     |
| 13    | 5  | -        | -       | -        | -     | -        | -     | -       | -     |
| 14    | 5  | -        | -       | -        | -     | -        | -     | -       | -     |
| 15    | 5  | +        | +       | +        | +     | +        | +     | +       | +     |
| 16    | 5  | -        | -       | -        | -     | -        | -     | -       | -     |
| 17    | 7  | -        | -       | -        | -     | +        | +     | +       | +     |
| 18    | 10 | -        | -       | -        | -     | -        | -     | -       | -     |
| 19    | 11 | -        | -       | -        | -     | +        | +     | +       | +     |
| 岡山症例1 | 不明 | -        | -       | -        | -     | +        | +     | +       | +     |
| 岡山症例2 | 不明 | -        | -       | -        | -     | +        | +     | +       | +     |

\*Con-PCR; Conventional PCR(安藤らの17kDa蛋白遺伝子を標的としたNested-PCR)

\*\*R-PCR; Real time PCR(花岡らのTaq-Man MGB probe real-time PCR)

\*\*\*Con-PCRにて検出された17kDa遺伝子はダイレクトシーケンスで*Rickettsia japonica*と100%相同を確認した

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）研究分担報告書

－九州地域におけるリケッチア症（つつが虫病と日本紅斑熱）の発生状況、長崎県中通島における日本紅斑熱のベクターと保有動物および宮崎県の日本紅斑熱発生におけるイノシシの役割に関する調査－

|       |       |                       |
|-------|-------|-----------------------|
| 研究分担者 | 山本正悟  | 宮崎県衛生環境研究所            |
| 研究協力者 | 松本一俊  | 熊本県保健環境科学研究所          |
|       | 平野 学  | 長崎県環境保健研究センター         |
|       | 北野智一  | 宮崎県衛生環境研究所            |
|       | 三浦美穂  | 宮崎県衛生環境研究所            |
|       | 八尋俊輔  | 熊本県保健環境科学研究所          |
|       | 山口顕徳  | 長崎県環境保健研究センター         |
|       | 田原研司  | 島根県保健環境科学研究所：研究分担者    |
|       | 片山 丘  | 神奈川県衛生研究所             |
|       | 古屋由美子 | 神奈川県衛生研究所：研究分担者       |
|       | 本田俊郎  | 鹿児島県立大島病院             |
|       | 御供田睦代 | 前鹿児島県環境保健センター         |
|       | 花岡 希  | 国立感染症研究所ウイルス第一部       |
|       | 藤田博己  | 大原総合病院附属大原研究所：研究分担者   |
|       | 高田伸弘  | 福井大学医学部：研究分担者         |
|       | 矢野泰弘  | 福井大学医学部               |
|       | 大橋典男  | 静岡県立大学：研究協力者          |
|       | 川森文彦  | 静岡県環境衛生科学研究所          |
|       | 川端寛樹  | 国立感染症研究所細菌第一部：研究分担者   |
|       | 安藤秀二  | 国立感染症研究所ウイルス第一部：研究分担者 |
|       | 岸本壽男  | 国立感染症研究所ウイルス第一部：研究代表者 |

研究要旨：九州地域はつつが虫病と日本紅斑熱の多発地域として知られており、なかでも熊本県では日本紅斑熱の患者がこの数年で急増している。また、2008年には宮崎県で初めての日本紅斑熱による死亡例も発生しており、これらの疾患に対する早期診断体制の確立に加え、病原体、ベクター、保有動物、感染リスク等の疫学情報の適切な提供が急務となっている。

今年度は、九州地域におけるつつが虫病と日本紅斑熱の発生状況を整理し、長崎県中通島における日本紅斑熱のベクターと保有動物の調査を実施した。さらに、宮崎県におけるイノシシの *R. japonica* に対する抗体および *R. japonica* の保有状況を検討し、以下の結果が得られたので報告する。

1. 2009年の九州地域におけるつつが虫病患者の報告数は、鹿児島県 59 例、宮崎県 20 例、大分県 17 例、長崎県 6 例、熊本県 6 例、福岡県 1 例、佐賀県 4 例の計 113 例で、全

国の患者数（455例）の25%を占めた。九州地域では、2007年、2008年と患者報告数が増加傾向にあったが、2009年には減少した。また、日本紅斑熱患者の報告数は、熊本県14例、鹿児島県9例、宮崎県5例、長崎県2例の計30例で、全国の患者数（125例）の24%であった。特に熊本県天草の上島では2007年以降患者が多発しており、その原因を明らかにすることがこの地域における今後の課題である。

2. 2009年8月に長崎県中通島で捕獲したマダニと野鼠から *R. japonica* の検出を試みたが、いずれも陰性であった。中通島ではこれまでに2例の日本紅斑熱患者の発生が報告されている。本地区を含め、発生地における日本紅斑熱の感染環の解明が今後必要である。

3. 日本紅斑熱の発生する宮崎県南東部で捕獲されたイノシシの35%が *R. japonica* に対して1:40以上の抗体を保有していたが、血液と脾臓から *R. japonica* は検出されなかった。今回、病原体の供給源としてのイノシシ重要性は示されなかったが、宮崎県の日本紅斑熱の感染環におけるイノシシの役割については、今後さらに検討する必要がある。

#### A. 研究目的

つつが虫病と日本紅斑熱は、それぞれ *Orientia* (*O.*) *tsutsugamushi* と *Rickettsia* (*R.*) *japonica* を病原体として、ダニで媒介される疾患である。また、いずれも発熱と発疹および刺口を特徴としており、感染症法では4類感染症の全数報告疾患に分類されている。

九州地域は両疾患の多発地域で、なかでも熊本県では日本紅斑熱の患者報告数がこの数年で急増している。また、2008年には宮崎県では初めての日本紅斑熱による死亡例が発生するなど、これらの疾患に対する早期診断体制の確立および、病原体、ベクター、保有動物、感染リスク等の疫学情報の適切な提供が急務となっている。この様な背景から、「九州地域におけるリケッチアを中心としたダニ媒介性感染症の疫学的解明とリファレンス体制の構築」を分担研究の課題とした。今年度は、疫学的解明の一環として、つつが虫病と日本紅斑熱の九州地域における発生状況を確認した。また、長崎県中通島で日本紅斑熱のベクターと保有動物の調査を実施した。さらに、日本紅斑熱の発生にシカやイノシシの生息状

況が関与している可能性が各地で指摘されているため、宮崎県の主な日本紅斑熱の発生地である県南東部で捕獲されたイノシシの *R. japonica* に対する抗体と *R. japonica* の保有状況を調査したので報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 患者発生状況

感染症発生動向調査による報告数を患者数とした。日本紅斑熱の発生地については各地研に問い合わせた。また、実態の把握に寄することを目的に、要望のあった地研に対して、診断用抗原の供給を行った。

##### 2. 長崎県中通島における調査

###### 1) 調査時期および調査地区

平成21年8月27日から29日にかけて、中通島の若松島および岩瀬浦郷、鯛ノ浦郷、有川郷、青方郷、太田郷でマダニを採取し、併せて野鼠の捕獲を実施した。

###### 2) *R. japonica* の検出

採取したマダニから藤田らの方法（リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築、平成

19年度 総括・分担報告書, p131-136) に準じて内容物を取り出した。この内容物から市販のキット (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、古屋らの方法 (J. Clin. Microbiol. 31, 637-640, 1993) (J. Clin. Microbiol. 33, 487-489, 1995) に準じて PCR を実施し、リケッチア属と *R. japonica* の 17kDa 蛋白質遺伝子の検出を行った。また、捕獲した野鼠の脾臓から市販のキット

(DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、前述と同様にリケッチア属と *R. japonica* の 17kDa 蛋白質遺伝子の検出を行った。

### 3) 野鼠の抗体保有状況

野鼠の血清について、間接蛍光抗体法で、*R. japonica* (YH 株) と *O. tsutsugamushi* (Karp, Kato, Gilliam, Kawasaki, Kuroki 株) に対する抗体価を調べた。なお、二次抗体には FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (Tago) を用いた。

## 3. イノシシの調査

### 1) 血液と脾臓の収集

宮崎県南東部の 5 地区および県北部の 1 地区の計 6 地区の猟友会に対して、猟期の 2009 年 11 月 15 日から 2010 年 3 月 15 日の間に捕獲されたイノシシの血液と脾臓の提供を依頼した。また、血液は冷蔵で、脾臓は冷凍でそれぞれ保存していただいた。

検体を受け取った後、血液については、3,000 rpm で 10 分間遠心して血清分離を行い、血餅を  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また、脾臓は半解凍した後、複数の切片 (巾 0.5cm 長さ 3cm 程度) を採取して同様に保存した。

### 2) 血清抗体価の測定

二次抗体に FITC 標識抗ブタ IgG 抗体 (Cappel) を用い、*R. japonica* (YH 株) および *O. tsutsugamushi* (Karp, Kato, Gilliam,

Kawasaki, Kuroki 株) に対する抗体価を間接蛍光抗体法で測定した。

## 3) *R. japonica* の検出

### ①血液と脾臓からの DNA 抽出

融解した血餅をバイオマッシャー (ニッピ バイオマトリックス研究所) で処理した後、処理血液  $100\mu\text{l}$  からキット (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。また、脾臓をホモジナイザーで乳剤とした後、その約 20mg から上記 Kit を用いて DNA を抽出した。

### ②TaqMan-MGB probe リアルタイム PCR

血液および脾臓から抽出した DNA を鋳型として、花岡らの TaqMan-MGB probe リアルタイム PCR 法 (Emerging Infectious Disease, vol. 15(12), 1994-1997, 2009) によって *R. japonica* の検出を行った。

## C. 研究結果

### 1. 患者発生状況

#### 1) つつが虫病

2009 年の九州地域におけるつつが虫病患者の報告数は 113 例で全国の患者数 (455 例) の 25% を占めた。各県における報告数は、鹿児島県 59 例、宮崎県 20 例、大分県 17 例、長崎県 6 例、熊本県 6 例、福岡県 1 例、佐賀県 4 例で、沖縄県を除く各県で発生が確認された。また、大分県を除く各県で昨年より報告数が減少した (表 1)。

#### 2) 日本紅斑熱

2009 年の九州地域における日本紅斑熱患者の報告数は 30 例で、全国の患者数 (125 例) の 24% を占めた。各県の報告数は、熊本県 14 例、鹿児島県 9 例、宮崎県 5 例、長崎県 2 例で、福岡県、佐賀県、大分県、沖縄県からの報告はなかった (表 2)。また、熊本県の主な発生地は天草の上島であった。鹿児島県と宮崎県での発生地は主として大隅半島から宮崎

県南東部にかけてであり、長崎県の2例は長与町と中通島での発生であった。

## 2. 中通島における調査

### 1) マダニの採取と *R. japonica* の検出

2属6種 (*A. testudinarium*, *H. longicornis*, *H. hystricis*, *H. formosensis*, *H. cornigera*, *H. yeni*) の計143個体が採取された(表3)。これらの多くは、*Anaplasma phagocytophilum* の検出に供した。残りの *A. testudinarium* 1個体、*H. longicornis* 5個体および *H. hystricis* 5個体のうち、*H. longicornis* 2個体からリケッチア属の17kDa蛋白質遺伝子が検出されたが、*R. japonica* の17kDa蛋白質遺伝子は検出されなかった。

### 2) 野鼠の抗体および *R. japonica* 保有状況

若松島、太田郷、青方郷、有川郷で計7匹のアカネズミが捕獲された。これら7匹の *R. japonica* に対する血清抗体価は1:80から1:1280であった。また、太田郷で捕獲された1匹のみがKawasaki株に対する抗体(1:40)を保有していた(表4)。

また、これら7匹のアカネズミから、リケッチア属および *R. japonica* の17kDa遺伝子は検出されなかった(表4)。

## 3. イノシシの調査

### 1) イノシシの血清抗体価

県北部の美郷町西郷区の猟友会が捕獲したイノシシ7匹および県南東部の5猟友会が捕獲したイノシシ83匹の血清について、*R. japonica* と *O. tsustugamsuhi* に対する抗体価を測定した。

#### ① *R. japonica* に対する抗体価

西郷区の7匹では、1匹(14%)のみが *R. japonica* に対する抗体(1:40)を保有していた。一方、県南東部で捕獲された83匹では、

29匹(35%)が1:40以上の抗体を保有し、これらのうち6匹が1:320以上の抗体価を示した(図1)。

#### ② *O. tsustugamsuhi* に対する抗体価

西郷区の7匹では、1匹(14%)のみがKuroki株に対する抗体(1:40)を保有していた。一方、県南東部の83匹では16匹(19%)がKawasaki株に対して、29匹(35%)がKuroki株に対してそれぞれ1:40以上の抗体を保有していたが、Karp, Kato, Gilliam株に対する抗体を保有する例はなかった(図1)。

### 2) *R. japonica* の検出

西郷区で捕獲されたイノシシ7匹の脾臓および7匹中6匹の血液から、*R. japonica* の17kDa蛋白質遺伝子は検出されなかった。

また、県南東部で捕獲されたイノシシ67匹の脾臓と66匹の血液からも *R. japonica* の17kDa蛋白質遺伝子は検出されなかった。

## D. 考 察

九州地域の日本紅斑熱については、鹿児島県の大隅半島から宮崎県の南東部に至る地域が多発地域として知られているが、2007年以降、熊本県における患者数の増加が著しい。熊本県では、2009年度も三重県と広島県に次ぐ患者発生が報告されており、この地域における多発の原因を明らかにすることが今後の課題となっている。また、特に天草(上島)に患者発生地が集中していることから、九州における日本紅斑熱の感染環を明らかにする上でも、重要な地域である。

一方、全数把握疾患となった1999年以降の九州地域におけるつつが虫病の報告数は、2000年の329例が最も多く、以後減少傾向を示し、2005年には71例にまで減少した。その後、2007年の113例、2008年の139例と増加傾向にあったが、2009年には2007年なみにまで減少した。患者の発生状況は疾患対



策にとって最も重要な情報であることから、今後さらにサーベイランス体制を強化し、適切なレファレンス体制を構築することが望まれる。

長崎県では、2006年から日本紅斑熱の患者が毎年確認されている。主な発生地は西彼杵半島基部の長与町であるが、福江島と中通島でも発生が確認されている。このため、今回、中通島の調査を行ったが、マダニと野鼠から *R. japonica* を検出することはできなかった。今後も、ベクターや保有動物の調査を継続し、五島列島における日本紅斑熱の感染環を明らかにする必要がある。

田原らは島根県における日本紅斑熱の発生にシカの生息状況が関連していることを指摘している。また、熊本県天草上島や鹿児島県大隅半島における患者発生にイノシシの生息状況が関与しているという指摘もある（私信）。今回、宮崎県の主な日本紅斑熱の発生地である県南部で捕獲されたイノシシについて調査した結果、35%が *R. japonica* に対する抗体を保有し、1:320以上の抗体価を示す例もあって、イノシシが *R. japonica* を含めた紅斑熱群リケッチアに暴露していることが示された。しかし、脾臓と血液から *R. japonica* は検出されず、病原体の供給源としてのイノシシの役割は確認されなかった。宮崎県の日本紅斑熱の感染環におけるイノシシの役割については、今後さらに検討したい。

#### E. 結論および課題

1. 九州地域では、この数年つつが虫病患者が増加する傾向にあったが、2009年には大分県を除く各県で患者数が減少した。九州地域における *O. tsutsugamsuhi* の系統別分布および媒介ツツガムシの分布については、近年の調査報告が無い。本疾患に対する的確な対策

の実施には、再調査による現状の確認が必要と思われる。

2007年から、九州地域における日本紅斑熱の患者数が急増している。地域的には、特に熊本県の天草（上島）地区における患者数の増加が著しい。天草（上島）における患者数増加の原因を含めて、今後も、各地における日本紅斑熱の感染環を明らかにする必要がある。

また、両疾患については今後も発生動向の把握に努め、公衆衛生上重要な情報を積極的に提供するため、サーベイランス体制の充実と、レファレンス体制の構築が必要である。

2. 長崎県の中通島で日本紅斑熱のベクターと保有動物の調査を行った結果、野鼠が高率に紅斑熱群リケッチアに対する抗体を保有することが確認されたが、ベクターや保有動物を明らかにすることはできなかった。中通島では2009年にも患者発生が確認されており、福江島を含めて今後も調査を継続する必要がある。

3. 日本紅斑熱の発生にイノシシの生息状況が関与しているという指摘がある。今回、宮崎県の主な日本紅斑熱の発生地である県南東部で捕獲されたイノシシについて抗体と病原体の保有状況を調査したが、病原体の供給源としてのイノシシの役割を確認することはできなかった。少なくとも媒介マダニの拡散に、関与していると思われるが、宮崎県の日本紅斑熱の感染環におけるイノシシの役割については、今後さらに検討する必要がある。

4. 近年、国内にもヒトアナプラズマ症の存在する可能性が示されている。つつが虫病や日本紅斑熱が強く疑われるにもかかわらず、これらを血清学的に否定される症例が多い。こ

のような症例にアナプラズマ症が含まれている可能性もあるため、今後、九州地域における本疾患の実態を調査する必要がある。

#### F. 健康危険情報

1) 第110回宮崎県皮膚科懇話会で、宮崎県内の皮膚科医を対象に「日本紅斑熱・つつが虫病の迅速診断」および「アナプラズマ症（静岡県立大学 大橋典男）」に関する研修を実施した。

#### G. 研究発表等

##### 1. 論文発表

1) Nozomu Hanaoka, Minenosuke Matsutani, Hiroki Kawabata, Seigo Yamamoto, Hiromi Fujita, Akiko Sakata, Yoshinao Azuma, Motohiko Ogawa, Ai Takano, Haruo Watanabe, Toshio Kishimoto, Mustunori Shirai, Ichiro Kurane and Shuji Ando Diagnostic Assay for *Rickettsia japonica* Emerging Infectious Disease, vol15, No, 12, 2009.

##### 2. 学会発表

1) 山本正悟, 安藤秀二, 岸本壽男:

つつが虫病および日本紅斑熱の早期診断における刺口(痂皮)の有用性. 第79回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 福岡県福岡市, 2009年11月19, 20日.

2) 山本正悟, 安藤秀二, 岸本壽男:

つつが虫病および日本紅斑熱の早期診断における刺口(痂皮)の有用性. 第16回リケッチア研究会, 東京都国立感染症研究所, 2009年11月7日.

3) 松本一俊, 松尾繁, 八尋俊輔, 原田誠也, 山本正悟, 安藤秀二: 熊本県における日本紅斑熱の発生状況とベクター. 第16回リケッチア研究会, 東京都国立感染症研究所, 2009年11月7日.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。

表1 九州地域におけるつつが虫病の年別報告数(感染症発生動向調査による)

|      | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 九州   | 186  | 329  | 165  | 127  | 175  | 122  | 71   | 76   | 113  | 139  | 113  |
| 福岡県  | 5    | 7    | 1    | 3    | 4    | 0    | 0    | 1    | 1    | 2    | 1    |
| 佐賀県  | 9    | 6    | 4    | 5    | 1    | 2    | 3    | 4    | 1    | 1    | 4    |
| 長崎県  | 24   | 30   | 11   | 1    | 7    | 12   | 7    | 10   | 6    | 10   | 6    |
| 熊本県  | 7    | 19   | 10   | 4    | 8    | 11   | 9    | 9    | 9    | 6    | 6    |
| 大分県  | 25   | 40   | 19   | 21   | 15   | 13   | 9    | 7    | 12   | 11   | 17   |
| 宮崎県  | 45   | 93   | 37   | 24   | 35   | 30   | 15   | 14   | 25   | 36   | 20   |
| 鹿児島県 | 71   | 134  | 82   | 69   | 105  | 54   | 28   | 31   | 59   | 72   | 59   |
| 沖縄県  | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    |

表2 九州地域における日本紅斑熱の年別報告数(感染症発生動向調査による)

|      | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 九州   | 9    | 5    | 12   | 10   | 16   | 15   | 23   | 18   | 33   | 38   | 30   |
| 福岡県  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 佐賀県  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 長崎県  | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 2    | 2    | 2    | 2    |
| 熊本県  | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 2    | 11   | 18   | 14   |
| 大分県  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |
| 宮崎県  | 7    | 0    | 4    | 3    | 2    | 3    | 5    | 1    | 4    | 7    | 5    |
| 鹿児島県 | 0    | 5    | 8    | 6    | 14   | 11   | 17   | 13   | 16   | 11   | 9    |
| 沖縄県  | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    |

表3 長崎県中通島におけるマダニ採取状況(2009年8月27日~28日)

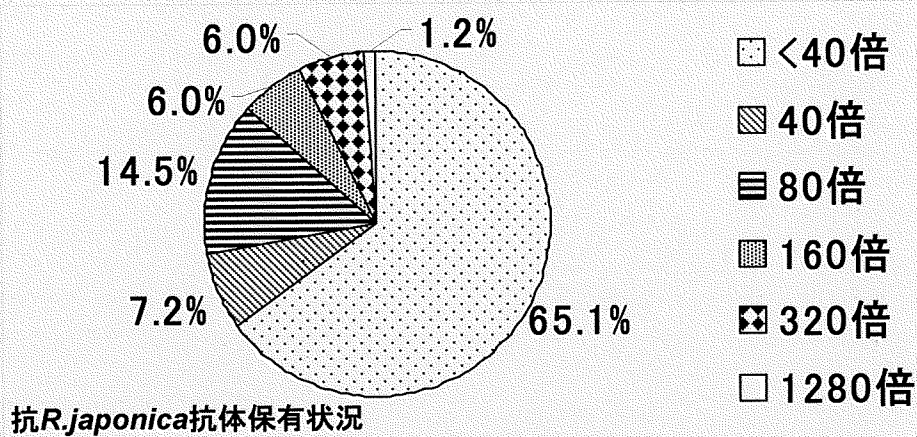
| 採取場所              | フタゲ<br>チマダニ |   |    | ヤマアラシ<br>チマダニ |   |   | タカサゴ<br>チマダニ |    | ツノ<br>チマ<br>ダニ | イエ<br>ン<br>チマ<br>ダニ |   | タカサ<br>ゴ<br>キラ<br>マ<br>ダニ | 計   |
|-------------------|-------------|---|----|---------------|---|---|--------------|----|----------------|---------------------|---|---------------------------|-----|
|                   | ♀           | ♂ | N  | ♀             | ♂ | N | ♀            | ♂  | ♂              | ♀                   | N | N                         |     |
| ①若松島<br>西神ノ浦郷     | 13          | 2 | 3  |               |   |   | 4            | 9  |                | 1                   |   |                           | 32  |
| ②若松島<br>中央小付近     | 14          | 1 | 7  |               |   |   | 2            | 19 |                | 1                   | 1 |                           | 45  |
| ③岩瀬浦郷<br>高山付近     | 2           |   | 1  | 1             |   | 1 |              | 1  |                |                     |   | 1                         | 7   |
| ④鯛ノ浦郷<br>(県道22号沿) | 4           |   | 1  |               | 1 |   | 6            | 28 |                |                     |   | 3                         | 43  |
| ⑤有川郷<br>一二三橋付近    | 3           |   | 2  |               |   | 1 | 3            |    | 1              |                     | 1 | 3                         | 14  |
| ⑥青方郷<br>青方ダム付近    |             |   |    |               |   | 1 |              |    |                |                     |   |                           | 1   |
| ⑦太田郷<br>小田川付近     |             |   |    |               |   |   |              |    |                |                     |   |                           |     |
| ⑧鯛ノ浦郷<br>小田越川付近   | 1           |   |    |               |   |   |              |    |                |                     |   |                           | 1   |
| ⑨鯛ノ浦郷<br>(県道22号沿) |             |   |    |               |   |   |              |    |                |                     |   |                           |     |
| ⑩有川郷<br>一二三橋付近    |             |   |    |               |   |   |              |    |                |                     |   |                           |     |
| 計                 | 37          | 3 | 14 | 1             | 1 | 3 | 12           | 60 | 1              | 2                   | 2 | 7                         | 143 |

表4 長崎県中通島で捕獲されたアカネズミの検査成績

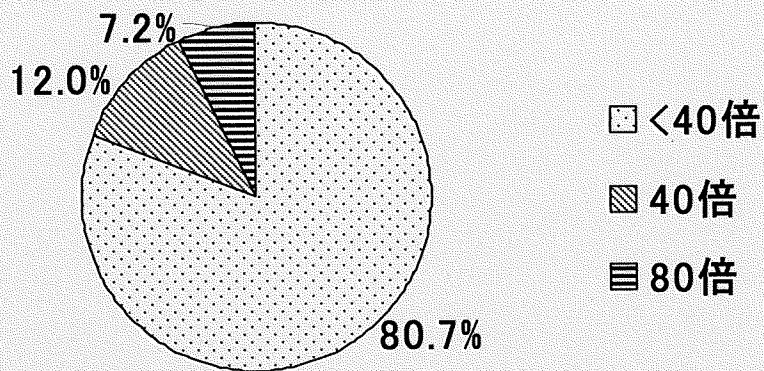
| 地区 | 性別 | ♂  | 血液PCR                 |                              | 脾臓PCR                 |                              | 血清抗体価       |      |      |              |            |      |
|----|----|----|-----------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|-------------|------|------|--------------|------------|------|
|    |    |    | Rickettsia<br>(17kDa) | <i>R.japonica</i><br>(17kDa) | Rickettsia<br>(17kDa) | <i>R.japonica</i><br>(17kDa) | Gilli<br>am | Karp | Kato | Kawa<br>saki | Kuro<br>ki | YH   |
| ②  | ♂  | 58 | —                     | —                            | —                     | —                            | <20         | <20  | <20  | 40           | <20        | 640  |
| ⑦  | ♀  | 49 | —                     | —                            | —                     | —                            | <20         | <20  | <20  | <20          | <20        | 320  |
| "  | ♂  | 66 | —                     | —                            | —                     | —                            | <20         | <20  | <20  | 40           | <20        | 80   |
| "  | ♀  | 41 | —                     | —                            | —                     | —                            | <20         | <20  | <20  | <20          | <20        | 1280 |
| ⑥  | ♂  | 59 | —                     | —                            | —                     | —                            | <20         | <20  | <20  | <20          | <20        | 320  |
| "  | ♂  | 60 | —                     | —                            | —                     | —                            | <20         | <20  | <20  | <20          | <20        | 320  |
| ⑩  | ♂  | 51 | —                     | —                            | —                     | —                            | <20         | <20  | <20  | <20          | <20        | 640  |

②: 若松島中央小付近、⑥: 青方郷青方ダム付近、⑦: 太田郷太田側付近、⑩: 有川郷一二三橋付近

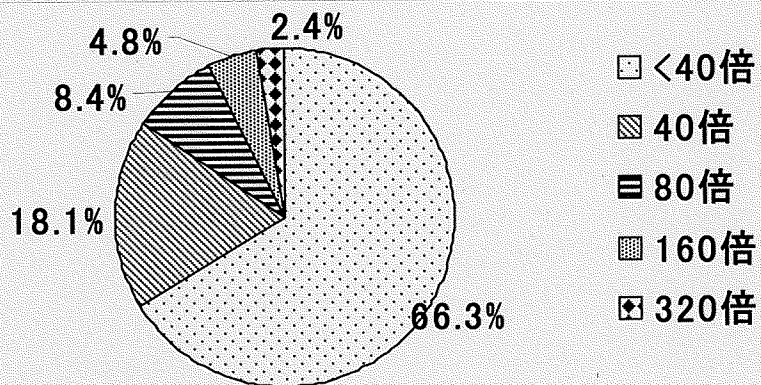
図1 宮崎県南部で捕獲されたイノシシのR. japonicaおよび  
O. tsustugamushi に対する抗体保有状況 (イノシシ頭数: 83頭)



抗R.japonica抗体保有状況



抗kawasaki株抗体保有状況



抗Kuroki株抗体保有状況

## 紀伊半島のマダニが保有するアナプラズマ属菌と静岡県のマダニが保有する紅斑熱群リケッチアの実態調査

研究分担者 大橋典男 静岡県立大学・食品栄養科学部・大学院生活健康科学研究科・教授

|            |                      |
|------------|----------------------|
| 研究協力者 川森文彦 | 静岡県環境衛生科学研究所         |
| 高田伸弘       | 福井大学医学部(研究分担者)       |
| 及川陽三郎      | 金沢医科大学医学部            |
| 岸本壽男       | 岡山県環境保健センター(研究代表者)   |
| 安藤秀二       | 国立感染症研究所(研究分担者)      |
| 川端寛樹       | 国立感染症研究所(研究分担者)      |
| 鳥日囃(ウリト)   | ヒューマンサイエンス・リサーチレジデント |
| 高娃(コウワ)    | 静岡県立大学大学院博士課程 1 学年   |
| 青地美南       | 静岡県立大学大学院修士課程 2 学年   |
| 呉東興(ウヅン)   | 静岡県立大学大学院修士課程 1 学年   |

### 研究要旨

日本国内におけるリケッチア関連細菌群(特に、紅斑熱群リケッチア、アナプラズマ属菌、およびエーリキア属菌)の実態を明らかにするため、2008年に和歌山県と三重県で採集したマダニからアナプラズマ属菌とエーリキア属菌の検出を試みるとともに(紅斑熱群リケッチアの検出については昨年度報告した)、静岡県におけるマダニが保有する紅斑熱群リケッチアを調査した。その結果、和歌山県と三重県のマダニにおいては、353匹中2匹のフタトゲチマダニと1匹のヤマトマダニからアナプラズマ属菌に特異的な *p44* 遺伝子群の PCR 産物が検出された。系統樹解析から、これらは米国のヒト分離株の *Anaplasma phagocytophilum* の *p44* 遺伝子群と近い関係にあることが判明した。これにより、紀伊半島のマダニは *A. phagocytophilum* を保有していることが初めて明らかとなった。エーリキア属菌の *p28* 遺伝子群の PCR 検出では、いずれのマダニからも増幅産物は得られなかった。また、静岡県の主に東部地域の調査では、採集した 2,566 匹のマダニのうち 726 匹について、紅斑熱群リケッチアの *gltA* 遺伝子を標的とした PCR を行った。その結果、181 匹 (24.9%) が陽性を示した。そして、これら PCR 産物の一部の塩基配列の解読結果を基に PCR-RFLP 型別法を構築し、これを用いてリケッチアの型別を行ったところ、主としてキチマダニが保有していた *Rickettsia japonica* タイプ (JAP) やシュルツェマダニとヤマトマダニが主に保有していた *R. helvetica* タイプ (HEL) を含む計 10 型に分類することができた。さらに、マダニからの紅斑熱群リケッチアの分離を試みたところ、ヤマアラシチマダニおよびタイワンクマダニからそれぞれ *R. japonica* を分離することに成功した。この結果は、静岡県では未だ日本紅斑熱が発生する可能性があることを示しており、今後も慎重に実態調査を継続する必要があるものと考えられる。

## 研究の背景

我々は、国内におけるリケッチア関連細菌群(特に、紅斑熱群リケッチア、アナプラズマ属菌、およびエーリキア属菌)の実態を明らかにするため、媒介ベクターであるマダニを各地で採集し、その唾液腺中に存在するこれらリケッチア関連細菌群を調査してきた。そして、これまでに、日本紅斑熱の発生地である鹿児島県、三重県、和歌山県で実態調査を行い、紅斑熱群リケッチアの *gltA* 遺伝子解析により、タカサゴチマダニ (*Haemaphysalis formosensis*) がこれまでに報告のない新型の紅斑熱群リケッチアを保有していることを明らかにした。また、アナプラズマ属菌の *p44* 遺伝子群の解析では、我々はすでに、静岡県、山梨県、青森県、岩手県のシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) とヤマトマダニ (*I. ovatus*) が、鹿児島県ではタカサゴキラマダニ (*Amblyomma testudinarium*) が、長崎県五島列島ではタカサゴチマダニ (*H. formosensis*) とオオトゲチマダニ (*H. megaspinosa*) が、沖縄県与那国島ではフタトゲチマダニ (*H. longicornis*) が、それぞれ *Anaplasma phagocytophilum* を保有していることを明らかにした。

また、*A. phagocytophilum* のヒト感染症例については、過去に高知県でリケッチア症と疑われた発熱性疾患患者の血液検体を調査したところ、2名の患者で *A. phagocytophilum* の感染が疑われる症例が見つかった。一例は *A. phagocytophilum* の単独感染か、あるいはボレリアとの混合感染が疑われ、もう一例は *A. phagocytophilum* と *Rickettsia japonica* との混合感染であった。従って、日本紅斑熱のみならず、その他のリケッチア関連感染症や混合感染の実態解

明も極めて重要な調査と位置付けられる。

以上のような背景のもと、本年度は、三重県と和歌山県のマダニが保有するアナプラズマ属菌とエーリキア属菌、ならびに静岡県東部に生息するマダニが保有する紅斑熱群リケッチアについて調査した。

## A. 研究目的

本研究は、まず、日本紅斑熱の発生が見られる紀伊半島のマダニが保有するアナプラズマ属菌およびエーリキア属菌について調査した。一方で、静岡県におけるリケッチア関連細菌群の調査も開始した。静岡県では、2000年9月に、東部地域の沼津市で日本紅斑熱が1例発生している。しかし、静岡県の紅斑熱群リケッチアについては、これまでに疫学調査がほとんどなされていない。そこで、本研究では、静岡県の主に東部地域のマダニが保有する紅斑熱群リケッチアについて調べた。

## B. 研究方法

### マダニからの紅斑熱群リケッチア、アナプラズマ属菌、およびエーリキア属菌の遺伝子検出と解析

2008年6月上旬に紀伊半島(和歌山県古座川町、和歌山県那智勝浦町、三重県志摩市、三重県鳥羽市、三重県伊勢市)で採集したマダニについて、これらの唾液腺DNAからアナプラズマ属菌の *p44* 遺伝子群とエーリキア属菌の *p28* 遺伝子群の検出を行った。得られた増幅産物はTA-cloningを行い、各クローンの塩基配列を決定した。

一方で、2008~2009年に静岡県の東部地域を中心に56地点で旗ざり法によりマダニを採集した。これらのマダニは1匹ずつ解剖して唾液腺を摘出し、DNA抽出を行っ

た。そして、これらの唾液腺 DNA から紅斑熱群リケッチアの *gltA* 遺伝子の検出を行った。得られた増幅産物の一部の塩基配列を解読し、この配列結果を基に PCR-RFLP 型別法を構築した。また、得られた塩基配列やアミノ酸配列を基に系統樹解析を行った。さらに、L929 細胞および HL-60 細胞を用いて、マダニからの紅斑熱群リケッチアの分離も試みた。

### C. 結果および考察

#### 1. 紀伊半島のマダニが保有するアナプラズマ属菌について

2008 年、紀伊半島（和歌山県古座川町、和歌山県那智勝浦町、三重県志摩市、三重県鳥羽市、三重県伊勢市）で採集した 352 匹のマダニについて、紅斑熱群リケッチアの *gltA* 遺伝子検出を行い、表 1 に示すように、PCR 陽性を示した 352 匹中 156 匹のリケッチア種の同定を行って昨年度報告した。

本年度は、このマダニ唾液腺 DNA からアナプラズマ属菌の *p44* 遺伝子群とエーリキア属菌の *p28* 遺伝子群の検出を試みた。アナプラズマ属菌に関しては、353 匹中 3 匹が *p44* 遺伝子群の PCR 産物が検出された（図 2、図 3）。PCR 陽性のマダニは、三重県鳥羽市河内で採集したフタトゲチマダニ（*H. longicornis*）とヤマトマダニの（*I. ovatus*）それぞれ 1 匹ずつ、また和歌山県古座川町池野山で採集したフタトゲチマダニ（*H. longicornis*）1 匹であった（図 2 と図 3）。エーリキア属菌の *p28* 遺伝子群の PCR 検出ではいずれのマダニからも増幅産物は得られなかった。PCR 増幅されたアナプラズマ属菌の *p44* 遺伝子群については、それぞれ TA-cloning を行い、各 *p44* 遺伝子クロー

ンの塩基配列を解読した。図 2 は、これらの *p44* クローンのアミノ酸配列を基にした系統樹を示す。ここで、3 匹のマダニからの *p44* クローンは、それぞれのマダニ個体ごとにクラスターを形成し、いずれも米国のヒト分離株の *A. phagocytophilum* の *p44* 遺伝子群のいずれかと近い関係にあることが判明した。

以上より、本研究では紀伊半島のマダニが *A. phagocytophilum* を保有していることを初めて明らかにした。

#### 2. 紀伊半島のマダニが保有するアナプラズマ属菌について

静岡県では、2000 年に日本紅斑熱患者が 1 例確認されたが、これまで疫学調査がほとんど実施されていなかった。そこで、紅斑熱の感染リスクを解明することを目的とし、静岡県で採集したマダニが保有する紅斑熱群リケッチアの DNA の検出と解析を行った。2008～2009 年に、静岡県の 56 地点において旗ざり法によりマダニの採集を行った（図 3）。得られたマダニは、4 属 13 種の計 2,566 匹であった（表 2）。このうち 726 匹について、マダニの唾液腺から DNA を抽出後、紅斑熱群リケッチアの *gltA* 遺伝子を標的とした PCR を行った。その結果、726 匹中 181 匹（24.9%）のマダニが PCR 陽性を示した（表 3）。そして、一部の塩基配列を解読し、その結果を基に 3 系統の PCR-RFLP による型別法を構築して（図 4）、PCR 陽性となったすべての増幅産物についてタイピングを行った。その結果、表 4 に示すように、主としてキチマダニが保有していた *R. japonica* タイプ（JAP）、キチマダニ（*H. flava*）、ヤマアラシチマダニ（*H.*



*hystrixis*)などが保有していた *Candidatus R. principis* タイプ (PRI)、キチマダニ (*H. flava*) とヒゲナガチマダニ (*H. kitaokai*) が主に保有していた *R. peacockii* タイプ (PEA)、フタトゲチマダニ (*H. longicornis*) が高率に保有していた LON タイプ (LON)、シュルツェマダニ (*I. persulcatus*) とヤマトマダニ (*I. ovatus*) が主に保有していた *R. helvetica* タイプ (HEL)、ヤマトマダニ (*I. ovatus*) が主に保有していた *R. asiatica* タイプ (ASI)、タカサゴキラマダニ (*A. testudinarium*) が保有していた *R. tamurae* タイプ (TAM)、タネガタマダニ (*I. nipponensis*) でみられた *R. monacensis* タイプ (MON) およびキチマダニ (*H. flava*) とオオトゲチマダニ (*H. megaspinosus*) で確認された *R. canadensis* タイプ (CAN) の計 10 型に分類できた。尚、キチマダニ (*H. flava*) の 1 匹から検出された *gltA* 遺伝子は、塩基配列が類似するリケッチアが見つからなかった。図 5 は 2008 年に採集したマダニから得られた *gltA* 配列を基にした系統樹を、また図 6 は 2009 年に採集したマダニから得られた *gltA* 配列を基にした系統樹を示す。ここで、日本紅斑熱リケッチアの *R. japonica* (JAP) は 2008 年に採集したマダニから検出されなかったが、2009 年に採集したマダニから検出された。一方で、L929 細胞および HL-60 細胞を用いて、3 属 8 種の計 43 匹のマダニからの紅斑熱群リケッチアの分離を試みたところ、表 5 に示すように、いずれの培養細胞においても、ヤマアラシチマダニ (*H. hystrixis*) およびタイワンカクマダニ (*D. taiwanensis*) からそれぞれ *R. japonica* を分離することができた。この結果は、静岡県では未だ日本紅斑熱が発生する可能性があることを示して

おり、今後も慎重に実態調査を継続する必要があるものと考え。

以上、本研究での成果は、日本国内に潜在するリケッチア関連細菌群の実態解明に大きく貢献するものと考え。

## E. 研究発表

### 1. 発表論文

- 1) Wuritu, Ozawa, Y., Gaowa, Kawamori, F., Masuda, T., Masuzawa, T., Fujita, H., and Ohashi, N. Structural analysis of a *p44/msp2* expression site of *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Med. Microbiol.* 58, 1638-1644 (2009)
- 2) Wuritu, Gaowa, Kawamori, F., Aochi, M., Masuda, T., and Ohashi, N. Characterization of *p44/msp2* multigene family of *Anaplasma phagocytophilum* from two different tick species, *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ovatus*, in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62, 142-145 (2009)

### 2. 学会発表

- 1) 大橋典男, 鳥日図, 高娃, 川森文彦, 高野愛, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽男: 国内初の新興感染症「アナプラズマ症」について. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋) 2009年3月12-14日
- 2) 青地美南, 高娃, 鳥日図, 川森文彦, 大橋典男: 紀伊半島のマダニから検出された紅斑熱群リケッチアDNAの解析. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋) 2009年3月12-14日
- 3) 川森文彦, 青地美南, 高娃, 廣井みどり, 神田隆, 杉山寛治, 大橋典男: 静岡県東部で採取されたマダニにおける紅斑熱群リ

ケッチア検出状況. 第82回日本細菌学会  
総会 (名古屋) 2009年3月12-14日

- 4) 大橋典男, 千屋誠造, 船戸豊彦, 塩尻正  
明, 高野愛, 川端寛樹, 安藤秀二, 岸本壽  
男: 国内初の新興感染症「ヒトアナプラ  
ズマ症」2症例について. 第83回日本感染  
症学会総会 (東京) 2009年4月23-24日
- 5) 大橋典男: エーリキア症とアナプラズマ  
症. 第21回日本薬学会・微生物学シンポ  
ジウム (福山) 2009年9月3日-4日
- 6) 川森文彦, 湊 千壽, 飯田奈都子, 山田  
俊博, 長岡宏美, 杉山寛治, 大橋典男:  
静岡県のマダニから検出された紅斑熱  
群リケッチア DNA の解析. 第148回日  
本獣医学会学術集会 (鳥取市) 2009年9  
月27日
- 7) 大橋典男, 青地美南, 高娃, 鳥日図, 川  
森文彦, 高田伸弘: 紀伊半島のマダニが  
保有するリケッチア関連細菌群の分子疫  
学調査. 第27回日本クラミジア研究会・  
第16回リケッチア研究会・合同研究発表  
会 (東京) 2008年11月7日
- 8) 川森文彦, 湊千壽, 山田俊博, 長岡宏美,  
杉山寛治, 大橋典男: 静岡県のマダニか  
ら検出された紅斑熱群リケッチアDNA  
の解析. 第27回日本クラミジア研究会・  
第16回リケッチア研究会・合同研究発表  
会 (東京) 2008年11月7日

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表 1. 紀伊半島のマダニにおける紅斑熱群リケッチア *glfA* 遺伝子、アナプラズマ属菌の *p44* 遺伝子群、およびエーリキア属菌の *p28* 遺伝子群のPCRスクリーニングの結果 (2008年に採集したマダニ)

| Tick species                                   | No. of ticks | <i>glfA</i> positive | <i>p44</i> positive | <i>p28</i> positive |
|--|--------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Haemaphysalis longicornis</i><br>(フタゲチマダニ)  | 130          | 108                  | 2                   | 0                   |
| <i>Haemaphysalis flava</i><br>(キチマダニ)          | 31           | 6                    | 0                   | 0                   |
| <i>Haemaphysalis megaspinosa</i><br>(オオトゲチマダニ) | 6            | 0                    | 0                   | 0                   |
| <i>Haemaphysalis hystrix</i><br>(ヤマアランチマダニ)    | 25           | 14                   | 0                   | 0                   |
| <i>Haemaphysalis formosensis</i><br>(タカサゴチマダニ) | 45           | 3                    | 0                   | 0                   |
| <i>Haemaphysalis kitaokai</i><br>(ヒゲナガチマダニ)    | 7            | 0                    | 0                   | 0                   |
| <i>Haemaphysalis cornigera</i><br>(ツノチマダニ)     | 11           | 1                    | 0                   | 0                   |
| <i>Ixodes ovatus</i><br>(ヤマトマダニ)               | 5            | 0                    | 1                   | 0                   |
| <i>Amblyomma testudinarium</i><br>(タカサゴキラマダニ)  | 92           | 24                   | 0                   | 0                   |
| Total  | 352          | 156                  | 3                   | 0                   |



図 1. 紀伊半島のマダニ採集地における *Anaplasma phagocytophilum* を保有するマダニ種

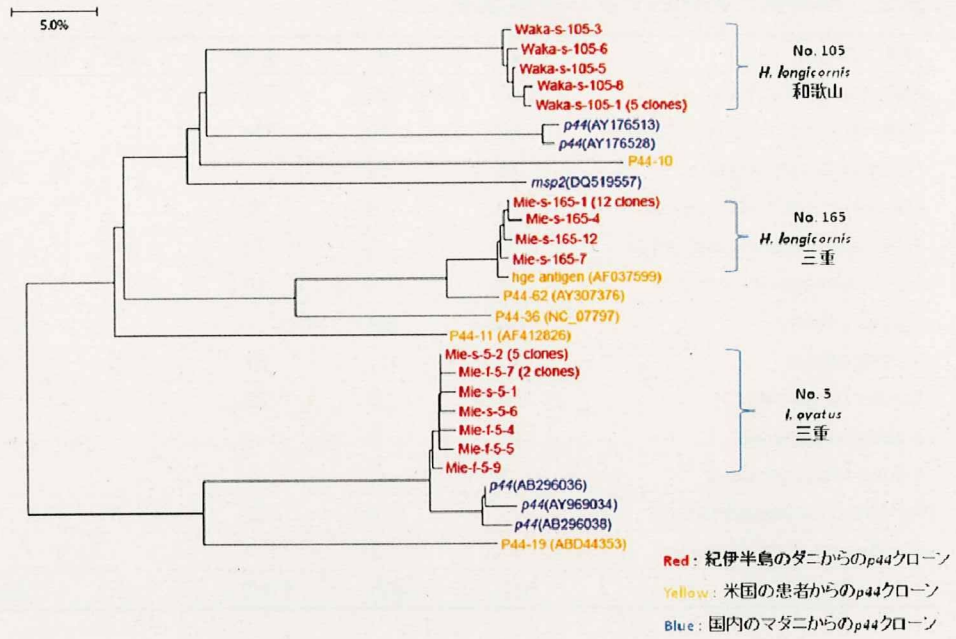


図2. 紀伊半島のマダニから得られた *Anaplasma phagocytophilum* のp44遺伝子クローンのアミノ酸配列を基にした系統樹解析

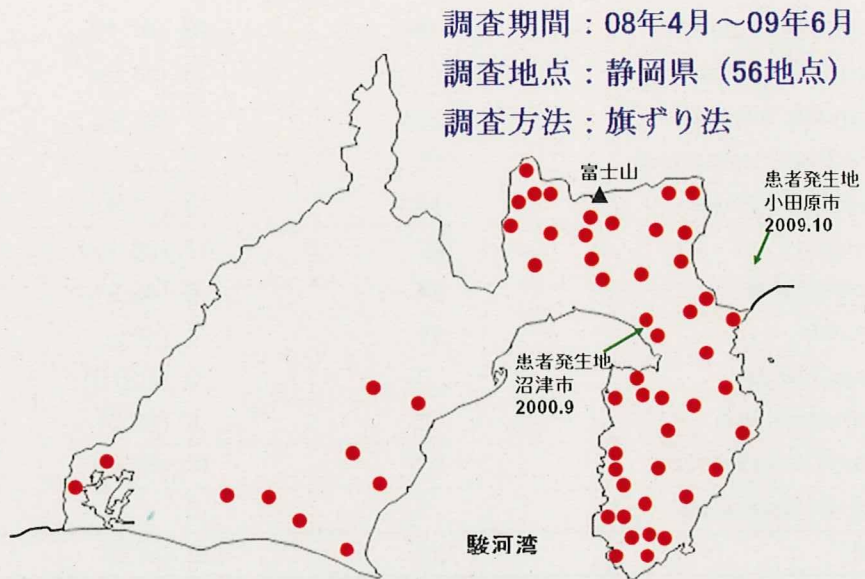


図3. 静岡県におけるマダニ採集地点